



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DIPARTIMENTO “PARIDE STEFANINI”
U.O.C. CHIRURGIA GENERALE E TRAPIANTI D’ORGANO**

Tesi di Dottorato di Ricerca in
“CHIRURGIA DEI TRAPIANTI D’ORGANO”

Direttore Prof. B.Pasquale Berloco

SICUREZZA DELL’EMOPERFUSIONE CON POLIMIXINE-B IN PAZIENTI TRAPIANTATI DI RENE E FEGATO

Relatore: Prof. Gilnardo Novelli

Dottorando: Dott. Alessandro Bussotti

Sessione 2012/2013

INDICE

Introduzione.....	3
Materiali e metodi.....	18
Risultati.....	23
Discussione.....	29
Bibliografia.....	34

INTRODUZIONE

Le complicanze infettive rappresentano la principale causa di mortalità e morbidità nei pazienti sottoposti a trapianto, e le infezioni batteriche rappresentano il 60-80% dei casi [1]. Il rischio di infezione così elevato nei pazienti trapiantati, è legato allo stato di immunosoppressione del paziente causato dalla malattia cronica che lo ha portato al trapianto, dallo stress chirurgico e soprattutto dalla terapia immunosoppressiva impiegata per evitare il rigetto acuto e cronico [1,2]. Per questo motivo il riconoscimento delle infezioni è più difficile nel paziente trapiantato rispetto ad individui con funzioni immunitarie normali. Il BSI (bloodstream infection) colpisce il 19-35% di pazienti trapiantati di fegato e il 15% di pazienti trapiantati di rene [2-4]. Il periodo critico per la comparsa delle infezioni gravi riguarda le prime due settimane dopo il trapianto [4]. Nonostante i progressi delle tecniche di terapia intensiva e l'utilizzo di nuovi farmaci, la sepsi rimane ancora oggi una grave complicanza in grado di mettere a rischio il graft trapiantato e spesso anche la vita del paziente [3,4]. L'endotossina, lipolisaccaride derivante da batteri Gram-negativi, è ritenuta responsabile della patogenesi della sepsi, dello shock settico e della conseguente malattia multiorgano (MOF). Perciò, per la cura della sepsi, è necessario rimuovere le endotossine dal corpo del paziente prima che la malattia degeneri. Ed è per questo che è importante fare una diagnosi precoce di attività endotossinica (AE) per poi applicare le appropriate terapie, in tempi brevi, che dovrebbero discostarsi dalle attuali terapie standard.

Il punto principale del nostro studio è stato quello di usare un nuovo test di attività endotossinica (endotoxin activity assay EAA), in modo da determinare l'AE nel sangue in maniera rapida e precisa, per ottimizzare una "target therapy" non

convenzionale. Abbiamo inoltre provato la validità e la sicurezza di una macchina che permette di rimuovere endotossine nel sangue usando un meccanismo di emoperfusione con fibre contenenti polimixine-B (PMX-DHP).

Attualmente non vi sono terapie convenzionali o tecniche in grado di effettuare tale rimozione in maniera selettiva. Il dispositivo, per l'appunto, utilizzato da noi e denominato Toraymyxin®, permette di agire sul problema “endotossina”, effettuandone la rimozione dall'organismo, contribuendo contemporaneamente ad un miglioramento complessivo del quadro clinico del paziente settico.

Il trattamento permette inoltre di ridurre la degenza dei pazienti nelle terapie intensive (migliorando i parametri vitali dei pazienti trattati); e questo porterebbe ad un impatto positivo sulla diminuzione sia delle spese ospedaliere proprie (assai elevate per i suddetti pazienti), sia, in una visione più ampia, del costo sociale per il reinserimento del paziente nella società. Questo studio si muove quindi nella direzione generale delle applicazioni tecnologiche alla medicina: maggior efficienza delle cure e tempi di recupero più brevi.

SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA (SIRS)

Questa sindrome è un insieme di risposte funzionali acute a vari insulti infettivi o non infettivi. La SIRS può realizzarsi per ustioni, traumi, pancreatiti o altri insulti severi di natura non infettiva.

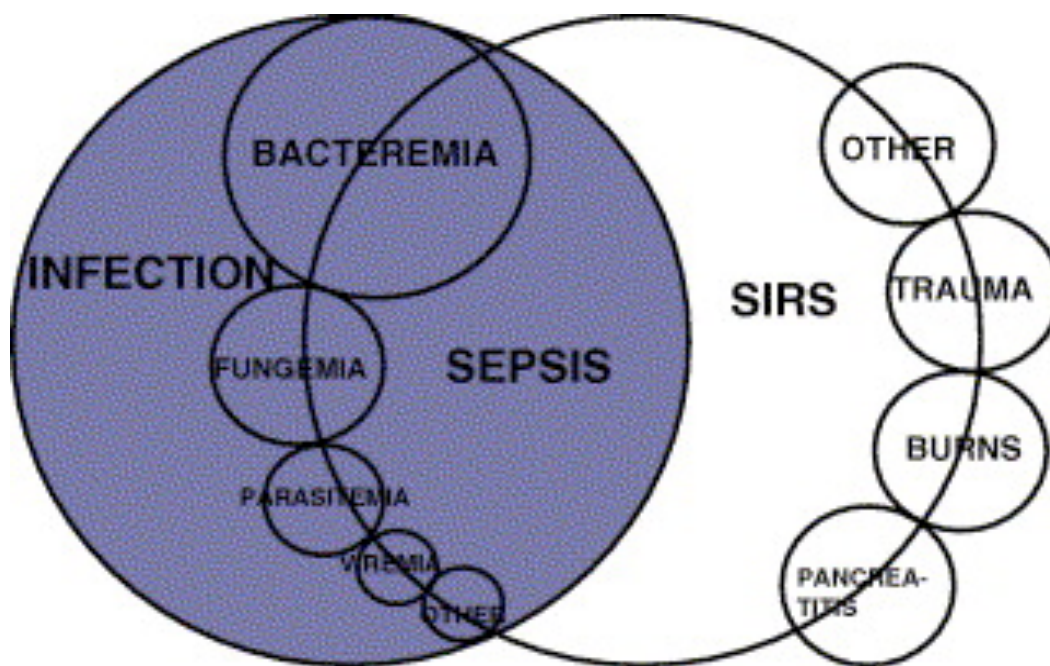


Fig 1: interrelazioni tra SIRS, sepsi ed infezione. Il grafico rappresenta le cause di risposta infiammatoria. La sepsi rappresenta un sottoinsieme di infiammazione sistemica. Il Toraymyxin agisce sull'area della sepsi, cioè una SIRS causata da infezione batterica.

La SIRS è definita dalla presenza di alcune manifestazioni cliniche. Durante la risposta infiammatoria sistemica si possono riscontrare temperature corporee minori di 36°C o maggiori di 38°C, accompagnate spesso da frequenza cardiaca maggiore di 90 bpm, frequenza respiratoria maggiore di 20 atti/min con una relativa PaCO₂ minore di 32mmHg. A questo quadro clinico si aggiunge una leucopenia evidente (< 4.000/mm³) o leucocitosi (> 12.000/mm³) accompagnate spesso dalla presenza di oltre il 10 % di polimorfonucleati neutrofili immaturi [5,6]. Questi ultimi dati si rilevano dalle analisi del sangue. Se la SIRS è causata da un'infezione, allora la sindrome è chiamata sepsi. Lo shock settico è una sepsi con ipotensione (pressione arteriosa sistolica minore di 90 mmHg o riduzione maggiore di 40 mmHg rispetto a quella di base - malgrado adeguato apporto di fluidi) [6]. Anormalità della perfusione sono presenti e risultano in acidosi lattica, in oliguria, in alterazioni acute dello stato mentale. Tali anormalità della perfusione possono

persistere nonostante aver conseguito la normalità della pressione arteriosa attraverso la somministrazione di agenti pressori. La sepsi severa è rappresentata da stato settico con compromissione d'organo, ipotensione o anormalità da ipoperfusione. Ciò rappresenta una fase evolutiva dalla sepsi allo shock settico. La sindrome da disfunzione multiorgano (MOF) è rappresentata da una alterazione funzionale di organo, che richiede l'intervento per preservare l'omeostasi [5,6].

SEPSI

La sepsi è considerata lo stato patologico in cui si viene a trovare l'organismo quando subisce l'invasione di microrganismi patogeni ed attiva una vigorosa risposta organica sistemica. Qualunque sia il focolaio di partenza, dopo l'iniziale risposta dell'organismo all'infezione (es. febbre, leucocitosi, segni clinici legati alla sede del focolaio settico, ecc.), la sepsi assume una reazione a carattere diffusivo sistemico con difficoltà di controllo da parte dei sistemi di difesa infettiva [5,6]. E' proprio in considerazione della vastità, della complessità, e dell'importanza di tale risposta fisiopatologica sul piano diagnostico e terapeutico, che la sepsi può essere considerata una "malattia acquisita del metabolismo intermedio", indotta da microrganismi, da loro prodotti e dalla stessa risposta immunologica dell'ospite all'invasione di agenti infettivi. La sepsi è causata dall'immissione in circolo di massicce e ripetute gittate batteriche continue o subcontinue che si manifestano mediante:

- fenomeni tossi-infettivi generali;
- localizzazione metastatiche.

È necessario distinguere il concetto di sepsi da quello di batteriemia, che è invece

un fenomeno fugace e transitorio, caratterizzato da isolate gittate batteriche nel sangue, e che solitamente non si accompagna a sintomi clinicamente rilevanti. La batteriemia si può avere in seguito ad estrazioni dentarie, spremitura tonsillare, cateterismo, colecistite ecc. L'elemento fondamentale che caratterizza la sepsi è il carattere persistente della presenza di batteri in circolo, che può essere legato o alla moltiplicazione di batteri nel sangue o, più spesso, alle ripetute gittate da un focolaio di partenza(5). Tutti i batteri possono portare alla sepsi, ma nel corso degli anni si è avuta una variazione tra le popolazioni batteriche che più frequentemente la causano. Numerosi sono i fattori che contribuiscono all'aumentata incidenza delle sepsi:

- uso scorretto e indiscriminato degli antibiotici;
- frequente ricorso a scopo diagnostico o terapeutico a manovre invasive, associate a largo impiego di cateteri venosi e altro materiale plastico;
- più lunga sopravvivenza dei pazienti affetti da neoplasie;
- aumento della vita media dei pazienti affetti da emopatie, AIDS, oppure pazienti ipogammaglobulinemici, cirrotici e trapiantati.

La patogenesi della sepsi può così venire schematizzata [6]:

- penetrazione del microrganismo attraverso una porta di entrata (cute, orofaringe, orecchio medio, vie respiratorie, vie digerenti, apparato uro genitale);
- formazione di un focolaio in cui i germi si moltiplicano (di solito rappresentato da una tromboflebite o da una linfangite);
- immissione dei batteri in circolo,
- localizzazione metastatiche.

L'esordio della sepsi è il più delle volte improvviso, con febbre, brividi e sintomi

generali a carattere tossi-infettivo. La febbre è in rapporto con l'immissione di germi nel torrente circolatorio, potendo rappresentare l'unica manifestazione morbosa. Può essere continua, remittente o intermittente. Costante è la presenza di una profusa sudorazione con conseguente disidratazione. I sintomi e segni di carattere tossi-infettivo testimoniano l'interessamento di quasi tutti gli organi e apparati:

- cardiovascolare, documentato da polso piccolo e frequente, talora aritmico, tachicardia, ipotensione e segni di sofferenza miocardica;
- nervoso, documentato da delirio, apatia, stato stuporoso;
- digestivo, documentato da lingua secca e fuligginosa, vomito, nausea;
- urinario, documentato da oliguria, proteinuria, ematuria, cilindruria;
- respiratorio, documentato da tachipnea, rumori patologici;
- cutaneo, con manifestazioni emorragiche [5,6].

Tra i dati di laboratorio si segnala anemia, leucocitosi o leucopenia, talora piastrinopenia e VES elevata.

Sulla base delle modificazioni fisiopatologiche è possibile riconoscere diverse fasi nella evoluzione del processo settico:

- fase preclinica;
- fase di compenso;
- fase di scompenso;
- fase di insufficienza pluriorganica o MOF.

FASE DI INSUFFICIENZA MULTIORGANICA (MOF) E SHOCK SETTICO

Questa fase è caratterizzata dal massimo sconvolgimento metabolico,

cl clinicamente riconoscibile per la progressiva disfunzione che conduce all'insufficienza di uno o più organi (polmoni, cuore, reni, fegato, sistema nervoso centrale, ecc.). La MOF è caratterizzata dall'esaurimento da parte dell'organismo di molte capacità di difesa, dall'indebolimento dei sistemi di ossidazione dei substrati energetici e dalla produzione di metaboliti anomali [5,6].

Spesso chi è affetto da sepsi o batteriemia causata da gram-negativi può presentare un quadro clinico molto grave, tipico dello shock settico, caratterizzato da insufficiente irrorazione dei tessuti e, nelle forme più gravi, da alterazioni irreversibili delle cellule [6]. Questa insufficienza circolatoria è dovuta all'aumento delle resistenze periferiche, allo sconfinamento del sangue nella microcircolazione, alla diminuzione della gittata cardiaca e alla anossia tissutale. I fenomeni vasoattivi che vanno sotto la dizione di "shock settico" non sono legati alla batteriemia, ma dipendono dalla liberazione in circolo di endotossine, le molecole lipopolisaccaridiche presenti nella parete dei germi (in particolare il lipide A che è proprio quello su cui la polimixina B agisce legandosi ad esso). La maggior parte delle sepsi da Gram-negativi e degli shock settici vengono osservati in pazienti ospedalizzati sottoposti a trattamenti intensivi, ad interventi operatori, a pratiche invasive (protesi, cateteri endovascolari) ed in pazienti immunocompromessi [5,6]. Quando compare lo shock settico, oltre ai normali sintomi da sepsi già descritti, si aggiungono tachicardia e tachipnea, ipotensione, estremità fredde e pallide spesso con cianosi periferica. Nei casi gravissimi si arriva all'insufficienza cardiorespiratoria ed al coma. La morte è di solito causata da edema polmonare, anossia generalizzata in seguito a grave insufficienza respiratoria, aritmie cardiache, coagulazione intravasale disseminata, anossia celebrale o ad una combinazione di più fattori.

LE ENDOTOSSINE E LORO ATTIVITA' (AE)

Le endotossine sono una particolare classe di tossine che derivano dalle membrane esterne dei batteri di tipo Gram-negativo [5,6]. Il riferimento "endotossina" si associa in particolare all'azione del complesso lipopolisaccaridico (LPS) che può trovarsi sulle suddette membrane. Nella sua collocazione primaria sulla membrana cellulare esterna dei batteri, il complesso lipopolisaccaridico (LPS) ha una funzione di regolatore di permeabilità: la membrana esterna è normalmente insensibile alle interazioni con l'ambiente, mentre l'LPS permette ad alcune sostanze (molecole di basso peso molecolare e idrofile) di oltrepassarla. Questa funzione di "filtro" protegge le cellule batteriche da aggressioni da parte dell'ospite, in forma di enzimi (es. lisozima), reazioni immunitarie (aggressioni di cellule fagocitarie) e altri "attacchi" di tipo chimico (es. sali biliari); l'LPS funge inoltre da mediatore nei confronti dell'ospite durante il riconoscimento come agente patogeno. La molecola corrisponde ad un complesso con caratteristiche sia idrofile che idrofobe, del peso medio di circa 10kDa; la composizione chimica specifica può variare anche ampiamente a seconda della specie batterica studiata. (Fig. 2) [7].

1. Componente lipidica: ha il nome di lipide "A" ed è formata dalla componente idrofoba del complesso; è la parte deputata all'ancoraggio alla parete cellulare. Chimicamente è strutturata come un dimero NAG (N-acetilglucosammina fosforilata) al quale sono connessi 6-7 acidi grassi saturi; questi ultimi possono essere direttamente attaccati al dimero o essere in forma esterificata (3-idrossiacidi). La parte lipidica risulta essere quella presentante il minor numero di varianti tra le varie specie e ceppi batterici del tipo Gram-negativo.

2. Componente polisaccaridica R (“cuore”): è composto da una catena semplice di zuccheri, legata al carbonio 6 del NAG. Tra le varie specie batteriche, la catena presenta un discreto numero di varianti, mentre risulta praticamente identica tra i ceppi della stessa specie batterica; caratteristica comune è però la presenza di due tipi di zuccheri piuttosto inusuali, l'eptosio e il KDO (acido 2-chetonico-3 deossiottanoico, che è presente in ogni tipo di endotossina; la sua unicità lo rende un apprezzabile indicatore per la presenza di endotossine).

3. Componente polisaccaridica O (“coda”): è l'elemento caratteristico delle varie endotossine: si trova unito all'estremità della catena R e consta di una serie di subunità oligosaccaridiche formate da 3-5 zuccheri; la catena può comprendere complessivamente fino a 40 subunità. Questa componente ha carattere idrofilo e presenta strutture tali da permettere alla cellula batterica di interagire con l'eventuale ospite. La componente polisaccaridica O è la parte del composto che prevede la maggior varietà a livello strutturale, varietà che si può riscontrare sia tra più specie batteriche sia tra i ceppi di una singola specie. Concorrono alla formazione della catena almeno 20 differenti tipologie di zuccheri, e alcune di queste (dideossiesosi) risultano esistere unicamente nei batteri Gram-negativi(5,6).

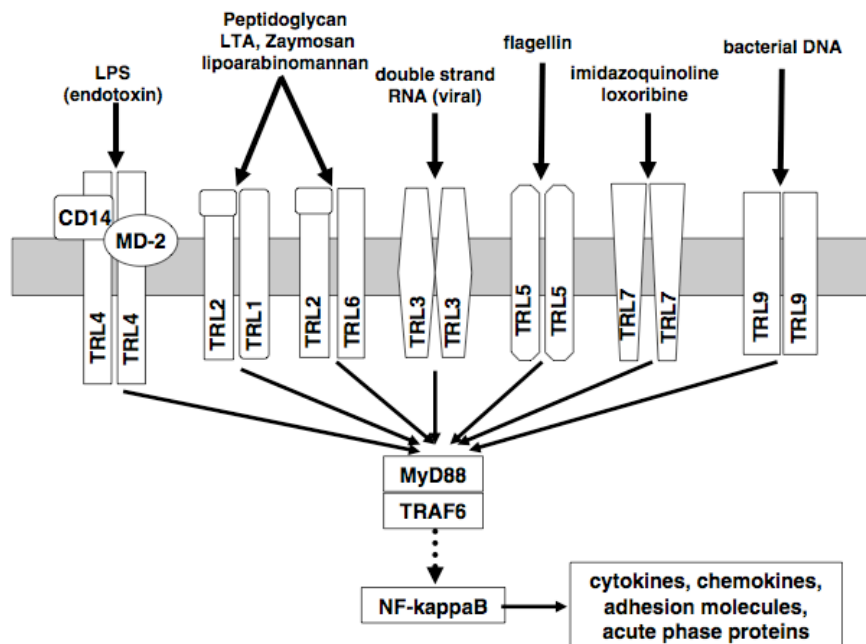


Fig. 2

TERAPIE CONVENZIONALI

La terapia della sepsi, dello shock settico e della MOF, si basa, attualmente, su tre linee di intervento:

1. eradicazione del focolaio settico d'origine, mediante una opportuna terapia antibiotica ed un eventuale trattamento chirurgico;
2. supporto farmacologico-strumentale delle funzioni d'organo, delle alterazioni fisiopatologiche e dello stato metabolico-nutrizionale;
3. applicazione di nuove forme di terapia farmacologica di tipo patogenetico (immunoglobuline, anticorpi monoclonali, modulazione dei mediatori della flogosi, antiossidanti, cortisonici, ecc.)(5,6).

In particolare nel trattamento di pazienti che presentano sintomi d'intossicazione da endotossine, risultano avere un ruolo fondamentale i trattamenti a base di

antibiotici; questi, oltre ad effettuare l'eliminazione dei microrganismi, hanno anche altri effetti, che sono notevolmente importanti durante il trattamento della sepsi. Un primo effetto particolare è quello di generare un rapido rilascio di endotossine, a seguito della lisi della parete batterica: questo fenomeno è noto come fenomeno di Herxheimer, come descritto nel paragrafo precedente dedicato agli antibiotici. Le tipologie di antibiotico impiegate, come precedentemente definite nel paragrafo, prevedono effetti contro le PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3; a questi vanno aggiunti gli antibiotici chinolonici. Ogni categoria prevede differenti effetti sull'organismo. Attualmente si cerca di progettare antibiotici che presentino, oltre a proprietà battericide, anche effetti positivi sullo stato generale di sepsi e che siano privi di effetti collaterali negativi [5,6].

POLIMIXINA B

La polimixina B ha la capacità di legare e neutralizzare le endotossine. La polimixina B è un gruppo di antibiotici derivanti dal *bacillus polymyxa*. Solo le polimixine B sono state adottate nella pratica clinica [7]. La neutralizzazione delle endotossine da parte della polimixine B è conosciuto da più di 40 anni, ma la loro pratica clinica è stata sempre limitata per la loro azione tossica nei confronti del rene e del sistema nervoso. Quindi si è cercato di creare un sistema che sfruttasse le capacità benefiche della molecola senza esporre i pazienti ai suoi effetti sistemici dannosi [7].

Il PMX (TORAYMYXIN®) è una cartuccia usata per emoperfusione, costituita da un involucro di materiale plastico contenente un adsorbente in fibra composita di polipropilene e α -cloroacetammide-metil polisterene a cui è ancorato un

antibiotico: il PL-B (polimixina B). Il legame fibra-antibiotico è di tipo covalente poiché il PL-B è dannoso se posto in circolo, ma è in grado di rimuovere le endotossine che vi entrano in contatto attraverso le fibre durante la emoperfusione o plasmaferesi, come dimostrato da numerosi studi preclinici. La polimixina è un polipeptide che causa effetti tossici se somministrato per via sistemica; tra tutte le polimixine solo la B e la E sono disponibili per uso clinico. La polimixina è un potente battericida che attacca la membrana batterica distruggendola per un effetto surfattante. È specifico per i Gram-negativi (come l'E. Coli) e i suoi effetti allergici sono poco frequenti. Il PL-B si lega al lipide A dell'endotossina, neutralizzandone l'attività, ed evita il suo rilascio a livello sistemico e i conseguenti rischi di neuro-nefrotossicità. Le fibre del PMX sono lavorate a maglia e formano un tessuto avvolto intorno al condotto centrale della cartuccia (Fig.3). Tale condotto presenta dei fori sulla parete laterale che permettono al sangue di distribuirsi radialmente, perfondendo in modo uniforme il tessuto adsorbente. Il polipropilene all'interno della fibra ha la funzione di supporto meccanico. La polimixina viene usata con due trattamenti a distanza di 24 h (2 h per trattamento) con un volume di flusso ematico pari a 100 ml/min. Importante a livello di monitoraggio è la pressione in e out del filtro (Max 500 mmHg in ingresso) [7].

STRUTTURA DELLA CARTUCCIA E PROCEDURA OPERATIVA

La cartuccia si presenta con un involucro esterno di materiale plastico che racchiude al suo interno un componente adsorbente, formato a sua volta da fibre su cui è immobilizzata la polimixina B. Le fibre sono lavorate a maglia in un tessuto avvolto attorno ad un condotto centrale. Da questo condotto, tramite dei fori, il sangue attraversa gli strati adsorbenti mediante un flusso radiale, per poi

fuoriuscire dalla parte superiore della cartuccia. Per l'utilizzo della cartuccia è necessaria una strumentazione ausiliaria che permetta di far circolare il sangue all'interno del dispositivo, che dia la possibilità di regolare flussi e che consenta la somministrazione di eparina. Di solito si utilizza una pompa sangue per la circolazione extracorporea con volume del flusso sanguigno pari a $50 \div 200$ ml/min collegato ad un monitor per controllo delle pressioni in ingresso e uscita dalla cartuccia. Sulle linee ematiche del sangue inoltre si collega una pompa per infusione di eparina. La circolazione extracorporea avviene mediante accesso venovenoso, inserendo un catetere a doppio lume nella vena femorale o nella succlavia [7].

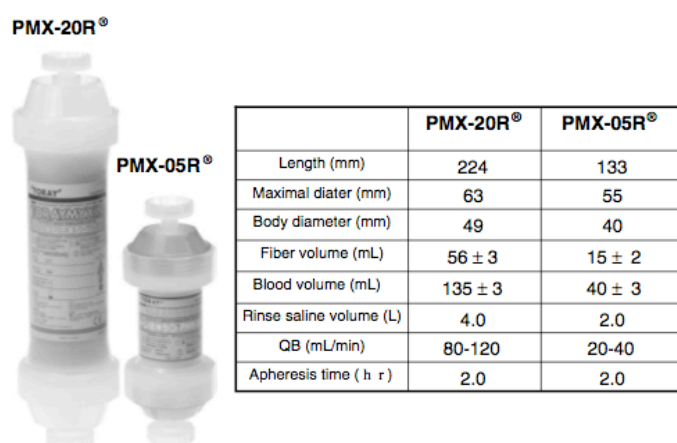


Fig. 2. Polymyxin B immobilized fiber column (Toraymyxin®). PMX-20R® was originally developed originally for adult patients with septic shock. PMX-05R® is a small size column available to use in pediatric or elder patients with small circulating blood volumes.

Fig. 3

Prima di procedere con l'utilizzo del Toraymyxin® occorre preparare la strumentazione e collegare la cartuccia con il circuito per la circolazione extracorporea (Fig.4).

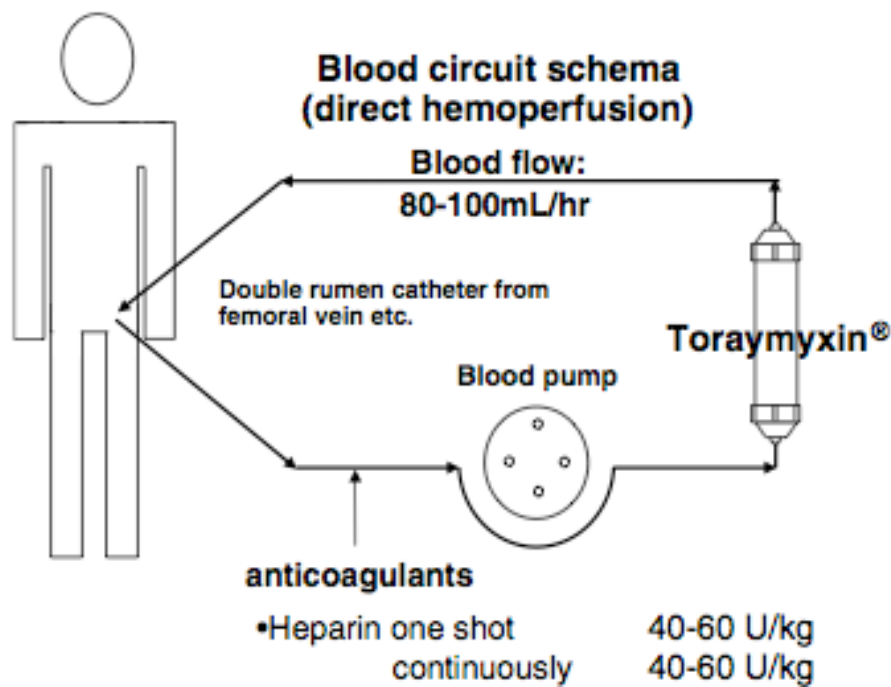


Fig 4: schematizzazione della procedura operativa. Sono evidenziati il paziente, la pompa, il filtro e i punti di rilevamento della pressione di ingresso e uscita (P_i , P_o).

Si risciacqua e si effettua il priming della linea arteriosa con soluzione fisiologica, assicurandosi che non siano presenti bolle d'aria. Si posiziona la camera a gocciolamento della linea venosa su un supporto; si connette la linea di monitoraggio della pressione al monitor della pressione di uscita (P_o) e si occlude la linea venosa posizionando una clamp vicino al connettore per il catetere. Si rimuove il tappo di uscita della cartuccia e si collega la linea venosa. La cartuccia viene capovolta (freccia verso il basso), si toglie il tappo di ingresso e si preme delicatamente la camera a gocciolamento per far uscire eventuali bolle d'aria presenti all'interno della cartuccia. Si collega quindi la cartuccia, posizionata con la freccia verso l'alto, alla linea arteriosa, precedentemente riempita di soluzione fisiologica. La procedura per l'utilizzo del Toraymyxin® si divide in quattro fasi, due delle quali sono fasi preparatorie, una è fase operativa e l'ultima è fase di arresto. Durante la fase di risciacquo si procede con il lavaggio della cartuccia utilizzando 4l di soluzione fisiologica. La procedura è necessaria in quanto il liquido contenuto

nella cartuccia si presenta acido a causa della sterilizzazione (autoclave). In questa fase si toglie la clamp posizionata sulla linea venosa in corrispondenza al connettore per il catetere e si aziona la pompa ad una velocità di flusso pari a 100 ml/min. Durante la fase di priming si rimuove la clamp sulla linea venosa e si fa fluire 500 ml di soluzione salina eparinata azionando la pompa ad una velocità di flusso pari a 100 ml/min. Si passa in seguito alla fase operativa che richiede di rispettare alcune condizioni fondamentali:

- velocità di flusso compresa tra gli 80 e i 120 ml/min;
- pressione di entrata nel dispositivo inferiore ai 250 mmHg con un margine di altri 25 mmHg prima di giungere alla rottura del dispositivo;
- durata del trattamento pari a circa 2 ore (a causa della saturazione del filtro);
- eparina in infusione di 3000 unità in bolo più 20 unità per kilogrammo ora in infusione.

Una volta che il circuito è stato preparato, si collega la linea arteriosa al catetere e si aziona la pompa ad una velocità ridotta (50 ml/min) per far fuoriuscire eventuali bolle d'aria. A questo punto si collega la linea venosa al catetere. Si somministra il bolo d'eparina e si aumenta la velocità del flusso fino a raggiungere la velocità di flusso di 100 ml/min. Al termine del trattamento, dopo aver preparato 500 ml di soluzione fisiologica per il recupero ematico, si arresta la pompa e si posiziona la clamp sulla linea arteriosa per poi rimuovere la linea arteriosa dal catetere. Si capovolge la cartuccia (freccia verso il basso), si aziona nuovamente la pompa per far fluire 100 ÷ 200 ml di soluzione e si rimuove infine la linea venosa [7].

MATERIALI E METODI

Abbiamo studiato 191 adulti che sono stati sottoposti a trapianto primario con un grafth da un donatore cadavere nel periodo compreso da Aprile 2008- Gennaio 2011 : 60 trapianti di fegato (escluse le urgenze) e 131 di rene. I ritrapianti e i trapianti combinati di fegato-rene sono stati esclusi. I criteri di inclusione sono stati: infezione sospetta dovuta alla presenza di almeno 2 dei 4 criteri della SIRS (systemic inflammatory response syndrome), quali febbre o ipotermia ($> 38\text{ C}$ o $< 36\text{C}$) , tachicardia (>90 batt/min), tachipnea > 20 batt/min; o $\text{Pa CO}_2 < 32$ mmHg, oppure ventilazione meccanica e $\text{GB} > 12.0 \times 10$ (alla 4) / L oppure $< 4.0 \times 10$ (alla 4)/L o almeno 10% neutrofili immaturi. Seguendo questi criteri, il test EAA, è stato condotto su 71 pz: 29 trapiantati di fegato e 42 di rene. Sono stati arruolati 28 pazienti (39.5%) con $\text{AE} > 0.60$ che hanno ricevuto il trattamento PMX-DHP per rimuovere le endotossine. 11 donne e 17 uomini avevano età media di 54 ± 4.7 anni. “The sequential organ failure assesment (SOFA)” è stato adottato per valutare la severità prima di cominciare il trattamento con DHP-PMX.

Nelle succeve 48 H post-operatorie, tutti i pazienti hanno ricevuto antibiotici profilattici: ampicillina sodica e inibitori delle B-lattamasi e sulbactam (nome commerciale Unasyn) 3 gr x 2 /die. L'esame colturale delle urine e del sangue sono state condotte su tutti i pazienti. Quando l'infezione era sospetta, venivano somministrata Meropenem 2 gr/ die e vancomicina 2 gr /die, come trattamento empirico iniziale, perche nella nostra esperienza clinica *Pseudomonas Aeruginosa*, ed *escrichiacoli* e *enterococcus*, rappresentavano i patogeni più frequenti. Il Trapiantato generalmente riceveva un inibitore delle calcineurine, corticosteroidi e

micofenolato mofetile (MMF) .I regimi di immunosoppressione nei 28 pazienti includevano Tacrolimus o ciclosporine, MMF e corticosteroidi nei 14 pazienti trapiantati di fegato (100%); ciclosporina , MMF e corticosteroidi in 4 pazienti trapiantati di rene (28.5%) e tacrolmus , MMF , e corticosteroidi in 10 pazienti Trapiantati di rene (72.5%).

Il prelievo è stato eseguito con tecnica standard , usando il raffreddamento in situ degli organi addominali con soluzione UW (University di Wisconsin).

Il trapianto di fegato ortotopico è stato condotto utilizzando la tecnica del piggy – back, lasciando la vena cava inferiore in situ senza una temporanea porto caval shunt in 13 pazienti. Nei rimanenti casi è stato effettuato un by-pass veno-venoso utilizzando una pompa centrifuga con tubi eparinizzati collegando le vene femorali e la porta alla vena ascellare. I trapianti di rene sono stati conodotti con ureteroneocistostomia, utilizzando la tecnica extra vescicale di Lich-Gregoir, posizionando un doppio J-J stent uretrale che è rimasto per 6-8 settimane . il catetere vescicale è stato rimosso in 6 giornata post-operatoria.

Nel nostro studio tutti i pazienti sono stati sottoposti atrattamento con PMX-DHP della durata di 2 h/ trattamento, con una velocità di 120 mL/min. tutti i pazienti sono stati trattati con PMX-DHP ogni giorno fino ad ottenere valore di EA (attività endotossinica) < 0.4. L'accesso vascolare è stato ottenuto inserendo un catetere doppio lume da dialisi nella vena giugulare interna o vena succlavia.

Per l'anticoagulazione abbiamo iniettato un bolo di 2500 UI di eparina frazionata all'interno del sistema dei tubi, nessun paziente era in supporto meccanico ventilatorio e i seguenti parametri clinici sono stati riportati prima e dopo ogni trattamento: parametri del fegato e della funzionalità renale, minzione, pressione arteriosa media (mAP), frequenza cardiaca (FC) , PaO2 / FiO2 ratio, conta dei GB

(globuli bianchi), con la percentuale di neutrofili ; acido lattico; e livelli di citochine infiammatorie.

LE CITOCHINE: campioni di sangue sono stati prelevati sia a tempo zero (T0) sia alla fine di ogni trattamento con PMX-DHP. Dopo 30 min sono stati centrifugati fino ad ottenere una quota di siero che è stato congelato a -70 per il successivo calcolo delle citochine. Sono stati misurati i livelli di Interluchina (IL) 6 (Immulite 2000; DPC Biermann, Bad Nauheim, Germany), e il fattore di necrosi tumorale (TNF) (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) (Grafico 1).

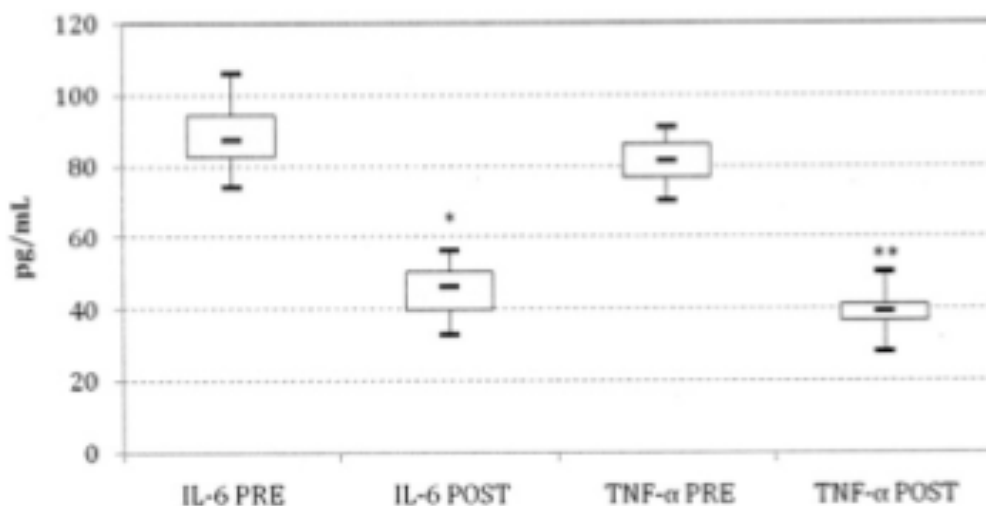


Grafico 1. Valore delle citochine prima e dopo il trattamento PMX-DHP. $P < .001$

TEST DI MISURAZIONE DELL'ATTIVITA' ENDOTOSSINICA (AE) (ENDOTOXIN ACTIVITY ASSAY (EAA))

L'AE (attività endotossinica) nel sangue intero è stata misurata come descritto da Romaschin et al [29], utilizzando un anticorpo monoclonale murinico IgM contrapposto il lipide-A di Escherichia coli. I campioni di sangue intero sono stati incubati con concentrazioni anticorpali di saturazione, quindi stimolati con zymosan.

Il complesso LPS / anti-LPS stimola i neutrofili del paziente per una aumentata risposta. La conseguente attività respiratoria è stata rilevata come luce emessa con l'uso di un chemiluminometro (SmartLine TL luminometer, Berthold); l'AE del campione di prova (anticorpi solo) può essere calcolata dal confronto con la misura basale (senza anticorpi) e lo stimolo massimo (4600 pg / ml di anticorpi più LPS) nello stesso campione di sangue. L'AE è espressa in unità relative derivate dall'integrale del basale e dalla chemiluminescenza stimolata della risposta. L'attività endotossinica può essere classificata come bassa per $AE < 0,4$, intermedia per $AE \leq 0,4 < 0,6$ e alta per $AE \geq 0,6$.

L'AE è stata misurata entro 24 ore dall'insorgenza dei sintomi di sepsi (T0). Se un $AE \geq 0,6$ fosse stato rilevato i pazienti sarebbero stati arruolati per la terapia di rimozione dell'endotossina (PMX). Al contrario l'AE veniva valutata 24 ore più tardi, come test di controllo e come valutazione di eventuali trattamenti.

ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono stati analizzati con SPSS per la versione windows 16.0 (SPSS, Chicago Illinois). I test non parametrici di wilcoxon (mann – whitney) hanno confrontato dei dati impari ($p < 0.05$) tra la linea base e la fine della terapia PMX-DHP. I dati emodinamici sono stati analizzati con l'utilizzo dell' analisi unilaterale della varianza (ANOVA) con un CI 95%. L'analisi del mAP e FC è stata inizialmente condotta raggruppando dati provenienti da pazienti trapiantati sia di fegato che di rene al fine di valutare l'effetto nel tempo.

La ripetizione del trattamento sullo stesso paziente è stata indicata T0 (trattamento iniziale e T1, T2, T3, T4 dopo il primo, secondo, terzo e quarto trattamento rispettivamente). Il calcolo ANOVA è stato quindi condotto separatamente per 3 volte su ogni pz che è stato sottoposto a 2 (gruppo HP2; n=14) , 3 (gruppo HP3 ; N=8) o 4 (gruppo HP4 ; N =6) trattamenti PMX-DHP. ANOVA è stata condotta per confrontare le differenze nell'efficacia della terapia PMX-DHP tra vari schemi di trattamento come 2, 3, 4, emoperfusioni. Il valore del Pt è stato utilizzato per valutare le correlazioni tra le varie variabili.

RISULTATI

14 trapianti di fegato e 14 trapianti di rene, effettuati hanno dimostrato livelli positivi di AE, e sono stati trattati con PMX-DHP: 11 trapianti di fegato effettuati entro i quindici giorni e 3 entro quarantotto giorni dopo il trapianto, mentre 6 trapianti di rene entro i trenta giorni, e 8 entro i settantaquattro giorni. Non si è verificata una correlazione significativa tra AE e il trattamento immunosoppressivo. Prima di condurre i trattamenti PMX-DHP, le medie AE erano 0.81 (range 0.62-1.25) per i trapianti di fegato e 0.73 (range 0.61-0.98) per i trapianti di rene. Un resoconto dei parametri clinici di questi pazienti prima e dopo i trattamenti PMX-DHP è riportato nella Tab. n.1.

Due trattamenti PMX-DHP sono stati condotti su 16 pazienti, 3 su 8 pazienti, e 4 su 4 pazienti. Non si sono verificati eventi avversi rilevanti durante le 72 procedure. Tra i trapianti di fegato, due trattamenti PMX-DHP sono stati condotti su 7 pazienti (AE media 0.69 con un range 0.62-0.76) 3 trattamenti su 4 pazienti (AE media 0.84 , range 0.77-0.91), e 4 trattamenti su 3 pazienti (AE media 1.11, range 0.95-1.25).

Alla fine della terapia di rimozione delle endotossine, il livello medio AE era 0.33 (range 0.22-0.4). Dopo l'ultimo trattamento PMX-DHP, quando i livelli di AE erano inferiori a 0.4, è stato osservato un significativo miglioramento nell'emodinamica , nei parametri di funzionalità epatica e nei valori delle citochine. All'inizio la valutazione dei parametri epatici dimostrava un aumento nei valori di bilirubina e transaminasi. Tutti i parametri hanno raggiunto valori normali tra i 5 ± 0.4 giorni dopo la fine della terapia. Ricerche microbiologiche hanno dimostrato la presenza

di infezioni gram-negativi in 8 pazienti tra 68.7 ± 5.2 H dopo l'arruolamento. I rimanenti 6 pazienti hanno riportato colture del sangue e delle urine negative. Considerando le indicazioni di EAA, i trattamenti PMX-DHP, sono stati condotti nei trapianti di fegato : 2 su 9 pazienti (AE media 0.67, range 0.61-0.72), 3 su 4 pazienti (AE media 0.8, range 0.78-0.82) e 1 su 1 paziente (AE media 0.98) (Grafico 2).

Valori soddisfacenti della minzione e dei parametri funzionalità renale sono stati raggiunti alla fine della terapia. Significativi miglioramenti nei parametri emodinamici e nei valori di citochina sono stati osservati anche nei trapianti di fegato. Il grafico 1 dimostra una significativa diminuzione ($P < .001$) in IL-6 e TNF-alfa alla fine della terapia extracorporea. Ricerche microbiologiche hanno dimostrato la presenza di infezioni gram-negativi in 13 pazienti trapianti di rene entro le 70 ± 2.4 H dopo l'arruolamento. Solo 1 paziente ha riportato colture delle urine e del sangue negative. L'infezione più comune riportata da pazienti che hanno subito il trapianto di rene è stata quella del tratto urinario (69.2%).

Il grafico 3 dimostra gli effetti di ciascun trattamento sulla PA (pressione arteriosa) media FC (frequenza cardiaca) in tutti i 28 pazienti. Gli effetti generali della terapia PMX-DHP hanno prodotto un abbassamento significativo sia per la PA e FC. Non è stata rilevata, al contrario, alcuna importante differenza dopo il primo trattamento di emoperfusione (T1), confrontato con i valori basali (T0). Dopo il secondo trattamento (T2) , i gruppi HP2 e HP3 hanno dimostrato dei significativi miglioramenti nei livelli di PA (HP2: $P < .001$; HP3: $P < .001$) e di FC (HP2: $P < .001$, HP3 : $P = .001$) in confronto con i valori basali (T0). Il gruppo HP4 al secondo trattamento ha raggiunto valori significativi per FC (HP4: $P = .013$) ma non per la PA (HP4 : $P = .152$), se confrontato con i valori basali.

Analisi condotte separatamente per i trapianti di fegato e i trapianti di rene hanno riportato risultati simili a quelli ottenuti per l'intero gruppo. Prendendo in considerazione i valori di PA e FC alla fine del secondo trattamento ($EA < 0.4$) le differenze significative scomparivano. ANOVA ha infatti documentato differenze non significative tra i gruppi sia per la PA (HP2 Vs HP3: $P=.646$; HP2 vs HP4: $P=.545$; HP3vs HP4 : $P=.973$) che per la FC (HP2 vs HP3: $P=.706$; HP2 vs HP4 : $P=.977$; HP3 vs HP4: $P = .682$).

I microrganismi isolati dalle colture del sangue in 21 pazienti dopo 69.4 ± 1.5 H di incubazione sono stati i seguenti: *pseudomonas aeruginosa* ($n=4$), *Klebsiella Pneumonie* ($n=2$), *proteus mirabilis* ($n=1$) , *escherichiacoli* ($n=10$), *enterococco faeci* ($n=4$), (Tab 2).

Dopo 30 giorni tutti i pazienti erano vivi con buona funzione del graft , e bassi livelli di attività di endotossina (Tab. 3).

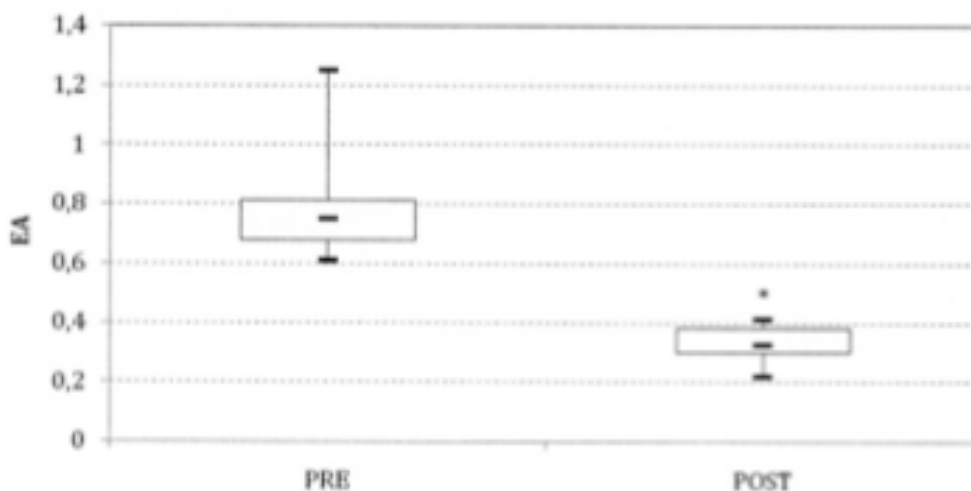


Grafico 2. Modificazione dell'attività endotossinica (AE) dopo trattamento di PMX-DHP. $P<.001$

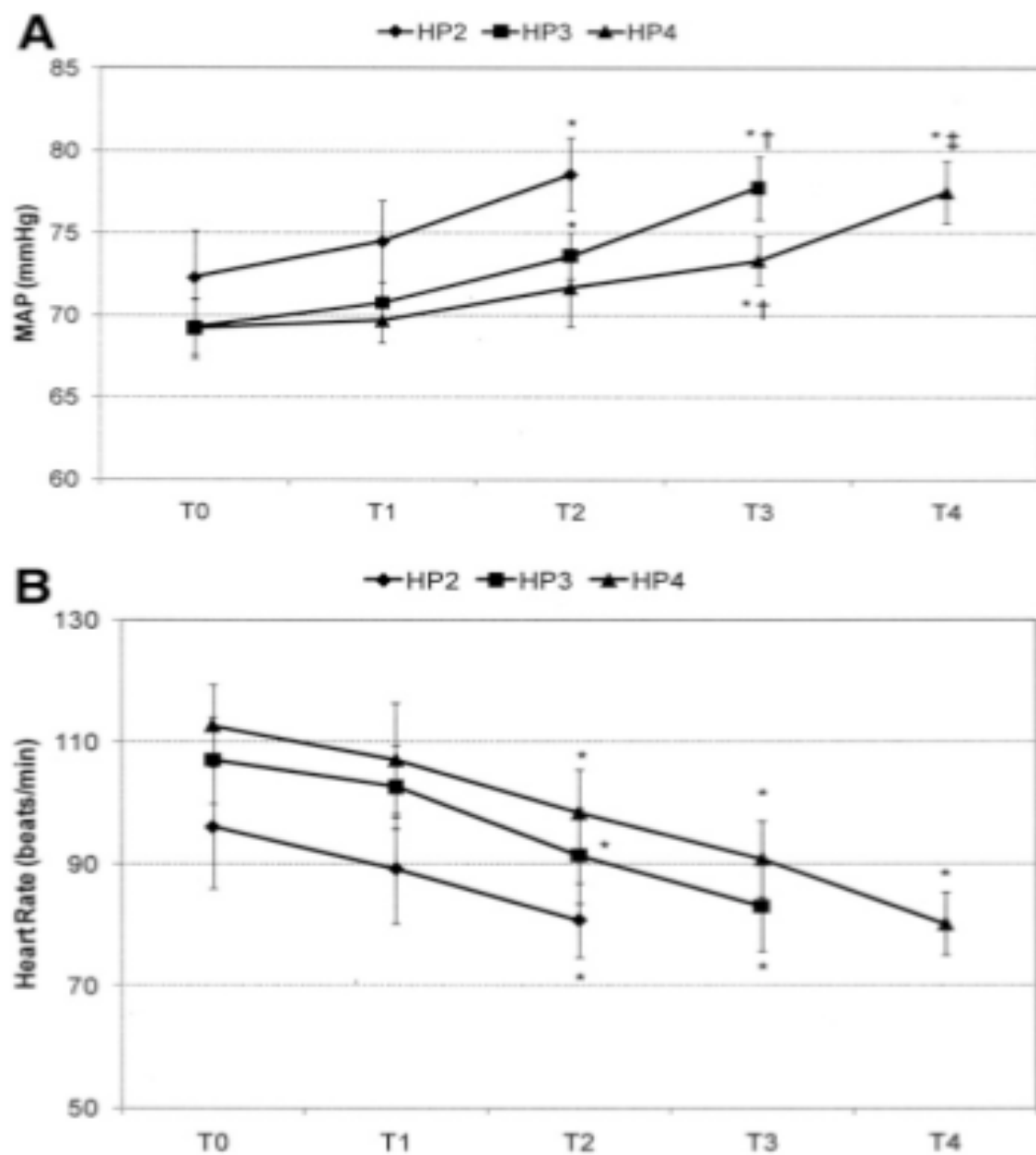


Grafico 3. Aumento della pressione arteriosa media (mPA) e della frequenza cardiaca (FC) dopo trattamento con PMX-DHP

Tab. 1 Cambiamenti biochimici, emodinamici e clinici di 28 pazienti trapiantati , prima e dopo il trattamento con PMX-DHP

	Liver Transplant (n = 14)		Kidney Transplant (n = 14)	
	Before	After	Before	After
T (C°)	37.4 ± 0.4	36.4 ± 0.5*	38.1 ± 0.9	36.1 ± 0.2*
mAP (mm Hg)	70 ± 2.88	82 ± 2.86*	72 ± 1.52	84 ± 0.21*
Heart rate (beats/min)	107 ± 3.55	78 ± 1.25*	110 ± 1.84	79 ± 2.67*
PaO ₂ /FiO ₂ ratio	287 ± 14.25	316 ± 10.26*	300 ± 12	331 ± 9.56*
WBC (10 ³ /mm ³)	12,480 ± 1,680	5,875 ± 2,110*	11,250 ± 2,180	6,950 ± 1,430*
Neutrophils (%)	82.22 ± 0.75	68.41 ± 4.22*	84 ± 1.50	70 ± 2.1*
Platelets (10 ³ /μL)	120 ± 46	119 ± 37	207 ± 34	205 ± 10
INR	1.42 ± 0.8	1.27 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Bilirubin (mg/dL)	8.4 ± 2.7	7.3 ± 1.8	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3
ALT (IU/L)	782 ± 95	635 ± 84	44 ± 2.5	43.55 ± 1.8
AST (IU/L)	655 ± 64	495 ± 56*	37.5 ± 1.1	33 ± 1.6
γ-GT (IU/L)	225 ± 43	172 ± 40*	29 ± 0.4	29.2 ± 0.5
BUN (mg/dL)	49 ± 9.56	31 ± 6.22	184.6 ± 31	102 ± 15.20*
Creatinine (mg/dL)	1.05 ± 0.88	0.7 ± 0.16	5.9 ± 1.4	4.3 ± 0.7*
Diuresis (mL/d)	1,660 ± 345	2,100 ± 488*	940 ± 104	1,850 ± 225*
SOFA	9 ± 0.8	5 ± 0.3*	7 ± 0.4	4 ± 0.6*
Lactate (mmol/L)	3.5 ± 1.4	0.7 ± 0.8*	2.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2*
IL-6 (ng/dL)	97.15 ± 21	48 ± 11.22*	84 ± 17.89	42 ± 0.4
TNF-α (ng/dL)	79.5 ± 16	32 ± 14.1*	61 ± 8.54	29 ± 6.25*
EA	0.81 [0.62–1.25]	0.33 [0.22–0.40]*	0.73 [0.61–0.98]	0.33 [0.29–0.39]*
30-day mortality	—	0/14	—	0/14

Tab. 2 Eziologia e colture di sangue isolate in 21/28 pazienti trapiantati

	Liver Transplant (n = 14)	Kidney Transplant (n = 14)
Pathogen		
Escherichia coli	6	4
Pseudomonas aeruginosa	1	3
Enterococcus faecium	1	3
Klebsiella pneumoniae	—	2
Proteus mirabilis	—	1

Tab. 3 Parametri dei pazienti trapiantati d fegato e rene con valori di AE a 30 gg (follow-up)

	Liver Transplant (n = 14)	Kidney Transplant (n = 14)
Bilirubin (mg/dL)	$>1.12 \pm 0.25$	—
ALT (IU/L)	69.5 ± 17.6	—
AST (IU/L)	82 ± 26.3	—
γ -GT (IU/L)	49 ± 34.2	—
BUN (mg/dL)	—	65.8 ± 24.3
Creatinine (mg/dL)	—	1.5 ± 0.8
Diuresis (mL/d)	—	2780 ± 450
EA	$0.22 [0.17-0.36]$	$0.27 [0.19-0.32]$

DISCUSSIONE

I pazienti con malattia cronica renale mostrano alterazioni biochimiche , immunologiche e infiammatorie. I fattori principali che causano questo disordine sono principalmente due: la sindrome uremica di per se, e il trattamento per l'uremia, in particolare quello emodialitico, che attiva fattori pro-infiammatori e AE , conferendo una suscettibilità maggiore alle infezioni dopo il trapianto [8,9].

I pazienti con malattia epatica cronica mostrano una risposta immunitaria impazzita, riflesso dovuto ad elevati livelli nel siero di citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie. Il meccanismo che porta a questo deficit include una diminuita produzione del complemento da parte del fegato malato (riduzione dei livelli di C3 e C4), compromissione della funzione delle cellule di Kupffer (fagocitosi), alterata chemiotassi dei neutrofili, e compromissione della clearance delle citochine infiammatorie [10-14]

I pazienti hanno inoltre dimostrato una diminuzione dell'attività battericida delle immunoglobuline contro i patogeni gram-negativi [15]. Tuttavia come risultato di questo deficit, il BSI rimane la preoccupazione maggiore nell'immediato post-operatorio dei pazienti trapiantati.

Il timing dell'infezione nel post-trapianto oggi può essere diviso in tre fasi:

infezione precoce, che mostra una predominanza di batteremia; un infezione intermedia, per lo più dovuta a patogeni virali e rigetto del graft; e ritardata, dovuta a problemi generali che riguardano tutti i pazienti operati come problematiche di

tipo respiratorio. Detto questo oggi si sta verificando un aumento di infezioni nei pazienti trapiantati nonostante i potenti farmaci antibiotici, usati per la prevenzione [16-17]. Ed in particolare si tratta sempre più di patogeni gram-negativi (come *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), portando di fatto ad una risposta infiammatori profondamente alterata, che spesso maschera la clinica, e questo deve spingerci a ricercare ogni sintomo o segno clinico con tutti i mezzi a disposizione, in modo da agire tempestivamente prima che sia troppo tardi [18-20]. Quindi, lavorare sulla prevenzione delle infezioni in pazienti trapiantati è diventato un punto cruciale e fortemente dibattuto nell'ambito della comunità internazionale sulla chirurgia dei trapianti.

In uno studio osservazionale retrospettivo di 3000 pazienti adulti con un' infezione sospetta, Shapiro et al [21], riporta i migliori risultati con mortalità del 1.3% in un gruppo di pazienti con SIRS, comparato con un gruppo affetto da sepsi severa con mortalità di 9.2%.

Il riconoscimento precoce di AE (attività endotossine) potrebbe essere la chiave di successo che determina il timing e l'outcome del paziente trapiantato che va in contro ad infezione. EAA (endotoxin activity assay) ci può aiutare a determinare (dopo appena 40 min) la presenza di AE nel sangue portandoci ad un trattamento di PMX-DHP immediato e mirato. In 6 pazienti (4 LTx e 2 KTx) il primo EAA test ha mostrato un risultato intermedio di AE (0.56); i livelli sono incrementati al secondo esame (24H dopo) raggiungendo un valore di AE di 0.68. Questi pazienti sono stati shiftati verso il gruppo dei trattati. Questo dato indica che è necessario eseguire la EAA anche dopo il primo risultato intermedio.

Il numero di trattamenti PMX-DHP è stato determinato sempre dalla misura dei livelli di AE prima e dopo ogni trattamento; ed ogni livello di AE è stato sempre più

basso dopo ogni trattamento.

Sette pazienti (25%) hanno mostrato alti livelli di AE in assenza di colture del sangue positive per infezioni batteriche. Questo probabilmente è avvenuto perché i trapiantati di rene, in particolare, mostrano il persistere di endotossine in circolo nonostante colture del sangue negative a causa dell'azione degli antibiotici e delle difese dell'ospite. Tutti i pazienti presentavano alti livelli di citochine con uno stato iperdinamico. Il trattamento antiendotossinico migliorava l'emodinamica e abbassava significativamente lo stato infiammatorio, come si osserva dalla diminuzione delle citochine, GB (globuli bianchi), e acido lattico. Difatti lo scopo dello studio era di mostrare che il quadro emodinamico in pazienti settici sottoposti a trapianto d'organo, fegato o rene che fossero, giovasse di trattamenti con PMX-DHP associati alla terapia standard antibiotica.

La mPA (pressione arteriosa media) aumentava e la FC (frequenza cardiaca) diminuiva significativamente dopo i trattamenti. La AE diminuiva progressivamente dopo ogni trattamento di PMX-DHP, indicando una disattivazione del sistema immunitario conseguente alla rimozione di endotossine neutralizzate dalla polimixina-B. Tuttavia i livelli di AE durante la terapia hanno dimostrato la selezione di un sottogruppo di pazienti che beneficiavano di un maggior numero di emoperfusioni (3 o 4 invece di 2) per raggiungere valori più bassi di AE. Questi pazienti erano caratterizzati da un peggior quadro emodinamico iniziale, ma l'estensione dei trattamenti hanno portato ad ottenere comunque valori di mPA e FC simili a tutti gli altri pazienti trattati. Il risultato è stato un miglioramento del SOFA score alla fine dei trattamenti con una sopravvivenza del 100% dei 28 pazienti a 30 giorni associato ad una buona funzione dell'organo trapiantato. Lo stesso Marshall et al [22] nel 2004 ha dimostrato una correlazione tra livelli di AE e

un peggioramento clinico del paziente trapiantato usando score predittivi come il SOFA , PaO₂ e GB.

I pazienti trapiantati di fegato (78.5%) hanno mostrato livelli più alti di AE rispetto ai pazienti trapiantati di rene (32.5%) entro i primi 15 giorni dal trapianto, confermati anche dallo studio di Linares et al [23]; e infine in accordo anche con lo studio di Berte et al [24], abbiamo osservato una maggiore incidenza di infezioni da Escherichia Coli tra i fegati (n=6) rispetto ai reni (n=4), trapiantati. Questo evento si spiegherebbe con la complessità tecnico-chirurgica del trapianto di fegato, poiché in questi pazienti si sviluppa un abbassamento delle difese a livello della barriera immunoprotettiva dell'apparato gastro-intestinale e biliare, che giustifica un maggior passaggio di batteri (soprattutto Escherichia Coli) dall'interno del tubo digerente al peritoneo e successivamente nel sistema circolatorio.[25,26]

Il sistema immunitario è parzialmente compromesso nei pazienti trapiantati d'organo dovuto sia allo stato generale clinico con cui il paziente arriva al trapianto, sia a causa dell'intervento chirurgico (soprattutto nel trapianto di fegato), sia per la terapia immunosoppressiva post-intervento [27,28]. Spesso è impossibile eradicare patogeni annidati all'interno dell'organismo con le terapie convenzionali. Avere la possibilità di poter identificare quei pazienti trapiantati che sono più a rischi di infezioni, con AE test, può rivelarsi una valida arma per prevenire quadri settici poi difficili da gestire. EAA è un test efficace e veloce per diagnosticare un'infezione precoce, che studia il ruolo della traslocazione delle endotossine, e ci aiuta a determinare il corretto timing per un intervento. Questo studio retrospettivo, seppur con un esiguo numero di pazienti, ci ha fornito una prospettiva differente per la gestione precoce dell'endotossinemia. In primis EAA si è dimostrato affidabile nell'identificare pazienti eleggibili per una target therapy e ha misurato l'efficacia

del trattamento PMX-DHP. Infine l' AE ci ha aiutato ad identificare quei casi in cui, l'assenza di colture positive per infezioni da gram-negativi, potevano far passare quei pazienti come falsi negativi ritardando un eventuale trattamento salvavita.

BIBLIOGRAFIA

1. Candel FJ, Grima E, Matesanz M, et al: Bacteremia and septic shock after solid-organ transplantation. Transplant Proc 37:4097, 2005
2. Fishman JA: Infection in solid-organ transplant recipients. N Engl J Med 357:2601, 2007
3. Palmer SM, Alexander BD, Sanders LL, et al: Significance of blood stream infection after lung transplantation: analysis in 176 consecutive patients. (Transplant 69:2360, 2000)
4. Silva M jr, Marra A, Pereira C, et al: Bloodstream infection after kidney transplantation: epidemiology, microbiology, associated risk factors, and outcome. Transplantation 90:581, 2010
5. Richard E. Reese, R.Gordon Douglas, Manuale pratico di malattie infettive, Arti Grafiche Editoriali, 1983
6. Gaetano Felice, Malattie infettive, Mc Graw-Hill, 1994
7. Tani, Kodama, Tsuchiya, Endotoxin removed from hemoglobin solution using polymyxin-B immobilized fibre (PMX-F) followed by new turbidometric endotoxin assay.
8. Goncalves S, Pecoits-Filho R, Perreto S, et al: Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. Nephrol Dial Transplant 21:2788, 2006
9. Stinghen A, Gonçalves S, Bucharles S, et al: Sevelamer decreases systemic inflammation in parallel to a reduction in endotoxemia. Blood Purif 29:352, 2010

10. Karvellas C, McPhail M, Pink F, et al: Bloodstream infection after elective liver transplantation is associated with increased mortality in patients with cirrhosis. *J Crit Care* 26:468, 2011
11. Adams HG, Jordan C: Infections in the alcoholic. *Med Clin North Am* 68:179, 1984
12. Wyke RJ: Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 28:623, 1987
13. Johnson DH, Cunha BA: Infections in cirrhosis. *Infect Dis Clin North Am* 15:363, 2001
14. Campbell AC, Dronfield MW, Toghil PJ, et al: Neutrophil function in chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 45:81, 1981
15. Fierer J, Finley F: Deficient bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 63:912, 1979
16. Fortun J, Martin-Davila P, Moreno S, et al: Risk factors for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 8:1065, 2002
17. Singh N, Wagener MM, Obman A, et al: Bacteremias in liver transplant recipients: shift toward gram-negative bacteria as pre-dominant pathogens. *Liver Transpl* 10:844, 2004
18. Gavalda J, Len O, San Juan R, et al: Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis* 41:52, 2005
19. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 11:R47, 2007
20. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, et al: Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 34:1638, 2008

21. Shapiro N, Howell M, Bates D, et al: The association of sepsis syndrome and organ dysfunction with mortality in emergency department patients with suspected infection. *Ann Emerg Med* 48, 2006
22. Marshall J, Foster D, Vincent J, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of MEDIC study. *J Infect Dis* 190:527, 2004
23. Linares F, Garcia-Gomez JF, Cervera C, et al: Early bacteremia after solid organ transplantation. *Transplant Proc* 41:2262, 2009
24. Bert F, Huynh B, Dondero F, et al: Molecular epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia in liver transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 13:359, 2011
25. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 7:108, 2003
26. Shimizu T, Yoshihiro E, Tsuchihashi H, et al: Endotoxin apheresis for sepsis. *Transfus Apher Sci* 35:271, 2006
27. Novelli G, Ferretti G, Morabito V, et al: Early management of endotoxemia using the Endotoxin Activity Assay and polymyxin B hemoperfusion. *Contrib Nephrol* 165:112, 2010
28. Tani T, Hanasawa K, Kodama M, et al: Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines, and plasminogen activator inhibitor-1 activities in septic patients. *World J Surg* 25:660, 2001
29. Romaschin AD, Foster D, Walker P, et al: Let the cells speak: neutrophils as biological markers of the inflammatory response. *SEPSIS* 2:119, 1998